

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/ES05/000046

International filing date: 03 February 2005 (03.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES

Number: P200400269

Filing date: 06 February 2004 (06.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 March 2005 (22.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCIÓN número 200400269, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 6 de Febrero de 2004.

Madrid, 3 de Marzo de 2005

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.

ANA M^a REDONDO MÍNGUEZ





MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200400269

4 FE -5 1 2004

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: CÓDIGO
MADRID 28

(1) MODALIDAD: <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD					
(2) TIPO DE SOLICITUD: <input type="checkbox"/> ADICIÓN A LA PATENTE <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA <input type="checkbox"/> PCT: ENTRADA FASE NACIONAL		(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD Nº SOLICITUD FECHA SOLICITUD			
(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL Proyecto de Biomedicina CIMA S.L.		NOMBRE OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Dpto. SECRETARÍA GENERAL REPRODUCCIÓN Panamá, 1 - Madrid 28071		NACIONALIDAD Española	CÓDIGO PAÍS ES
				DNI/CIF B3179060603	CNAE PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE: DOMICILIO Plaza Pintor Paret 5, 1ºF LOCALIDAD Pamplona PROVINCIA Navarra PAÍS RESIDENCIA España NACIONALIDAD Española		TELÉFONO 948 425 727 FAX 948 425 715 CORREO ELECTRÓNICO ferrasti@unav.es CÓDIGO POSTAL 31008 CÓDIGO PAÍS ES CÓDIGO PAÍS ES		
(7) INVENTOR (ES): HERMIDA SANTOS MONTES DIAZ HURTADO LINARES		NOMBRE José Ramón Verónica	NACIONALIDAD Española Española Española	
(8) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR		(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: <input type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN		

(10) TÍTULO DE LA INVENCION: MÉTODO PARA EVALUAR EL RIESGO Y LA PREDISPOSICIÓN A DESARROLLAR UNA PATOLOGÍA RELACIONADA CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS FRENTA A EPCR			
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO			
(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR			
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	FECHA
(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES <input type="checkbox"/>			
(15) AGENTE /REPRESENTANTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)			

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: <input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 30 <input checked="" type="checkbox"/> Nº DE REIVINDICACIONES: 39 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 3 <input checked="" type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 3 <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD		DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input type="checkbox"/> CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN <input type="checkbox"/> OTROS:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE (VER COMUNICACIÓN)
NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN: Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.		FIRMA DEL FUNCIONARIO 	



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

3200400269

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

MÉTODO PARA EVALUAR EL RIESGO Y LA PREDISPOSICIÓN A DESARROLLAR UNA PATOLOGÍA RELACIONADA CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS FREnte AL EPCR

El método para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR), tal como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular o complicaciones obstétricas, se basa en la detección y cuantificación in vitro de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra de dicho sujeto.

GRÁFICO



(12)

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(21) NÚMERO DE SOLICITUD
200400269

(31) NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD (32) FECHA	(33) PAÍS	(22) FECHA DE PRESENTACIÓN
(71) SOLICITANTE (S) Proyecto de Biomedicina CIMA S.L.			(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
DOMICILIO Plaza Pintor Paret 5-1ºF. 31008 Pamplona		NACIONALIDAD Española	
(72) INVENTOR (ES) HERMIDA SANTOS José, MONTES DÍAZ Ramón, HURTADO LINARES Verónica			
(51) Int. Cl.	GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)		
(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN MÉTODO PARA EVALUAR EL RIESGO Y LA PREDISPOSICIÓN A DESARROLLAR UNA PATOLOGÍA RELACIONADA CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS FRENTE AL EPCR			

(57) RESUMEN

MÉTODO PARA EVALUAR EL RIESGO Y LA PREDISPOSICIÓN A DESARROLLAR UNA PATOLOGÍA RELACIONADA CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS FRENTE AL EPCR

El método para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR), tal como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular o complicaciones obstétricas, se basa en la detección y cuantificación in vitro de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra de dicho sujeto.

MÉTODO PARA EVALUAR EL RIESGO Y LA PREDISPOSICIÓN A DESARROLLAR UNA PATOLOGÍA RELACIONADA CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS FRENTE AL EPCR

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el empleo de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la proteína C/proteína C activada (EPCR) como marcador para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR, tal 10 como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular o complicaciones obstétricas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Enfermedades autoinmunes

15 Las enfermedades autoinmunes son unas enfermedades que se caracterizan por la presencia de reacciones inmunológicas en las que algo desencadena la reacción del sistema inmune contra los propios tejidos del cuerpo y la producción de anticuerpos anormales que atacan a dichos tejidos (autoanticuerpos). Entre dichas enfermedades autoinmunes se encuentran el síndrome antifosfolípido (SAF), la artritis reumatoide, el 20 lupus eritematoso sistémico, las vasculitis autoinmunes en general, etc.

El SAF se caracteriza por trombosis vascular (venosa, arterial o microvascular) y complicaciones en el embarazo (muerte fetal, nacimiento prematuro o aborto espontáneo múltiple) asociadas con la presencia de anticuerpos antifosfolípido. Estos anticuerpos son heterogéneos y reconocen una variedad de combinaciones de fosfolípidos, proteínas de unión de fosfolípidos o ambas. Los subgrupos más comúnmente detectados de anticuerpos antifosfolípido son los anticuerpos anticoagulante lúpico (ACL), anticuerpos anticardiolipina y anticuerpos antiglicoproteína I β_2 . Otros anticuerpos antifosfolípido no incluidos en los criterios clásicos de laboratorio están actualmente bajo estudio. Tales anticuerpos están dirigidos 25 frente a fosfolípidos distintos a la cardiolipina, tales como la fosfatidiletanolamina, o frente a proteínas de unión de fosfolípidos, tales como la anexina V y la proteína S. Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos que relacionan la presencia de anticuerpos antifosfolípido con la trombosis vascular y la calidad del embrión.

Enfermedades vasculares

Las enfermedades vasculares son de tres tipos fundamentales dependiendo del tipo de vaso afectado (arterial, venoso o vasos de pequeño calibre de la microcirculación). En el caso de las enfermedades vasculares arteriales se produce una esclerosis de su pared que disminuye el flujo a través de su luz y, por lo tanto, disminuye de modo crónico el aflujo de sangre a los territorios irrigados por esa arteria lesionada. La lesión ateroesclerótica se puede complicar y originar un trombo dentro de la arteria taponando totalmente el vaso y cerrando de este modo el flujo de sangre, en cuyo caso se produce un infarto. Los más frecuentes son el infarto de miocardio cuando la arteria trombosada es una arteria coronaria y el infarto cerebral cuando la arteria trombosada es una arteria que riega el cerebro. En el caso de enfermedad vascular venosa la trombosis origina una dificultad en el retorno de la sangre al corazón. Cuando un fragmento del trombo de la pared venosa trombosada se libere entonces migrará hasta quedar atrapado en la circulación venosa pulmonar, originando una insuficiencia pulmonar aguda, conocida como embolia pulmonar. Las enfermedades de la microcirculación se producen por inflamación y/o trombosis de los vasos de la microcirculación de los diferentes órganos y se manifiestan como fracaso de la función del órgano cuya microcirculación está dañada. Las enfermedades vasculares constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad en los países occidentales. Concretamente, según datos del Instituto Nacional de Estadística del año 2.000, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en España (35,0% aproximadamente del total de defunciones). Entre las causas cardiovasculares más frecuentes, las enfermedades vasculares o trombóticas arteriales del corazón (principalmente el infarto agudo de miocardio) constituyen la primera causa de muerte. Actualmente se conocen varios factores de riesgo moleculares que pueden explicar la aparición de trombosis en algunos pacientes, uno de estos factores de riesgo es la presencia de los denominados anticuerpos antifosfolípido. Originalmente se pensó que estos autoanticuerpos estaban dirigidos frente a fosfolípidos aniónicos; no obstante, posteriormente se ha demostrado que muchos de esos autoanticuerpos están dirigidos frente a complejos que algunas proteínas, tales como la glicoproteína I $\beta 2$ o la protrombina, forman con los fosfolípidos. Más recientemente también se han implicado otras proteínas con función anticoagulante, tales como la proteína C (PC), la proteína S,

la trombomodulina o la anexina V, lo cual explicaría por qué la presencia de estos autoanticuerpos predisponen a la trombosis.

Complicaciones obstétricas

- 5 Las complicaciones obstétricas son fundamentalmente: la muerte fetal después de la décima semana de embarazo, el nacimiento de niños prematuros, los abortos espontáneos antes de la décima semana del embarazo, el retraso del crecimiento intrauterino, la eclampsia y la pre-eclampsia.

10 EPCR

La proteína C activada (PCA) es una de las proteínas principales reguladoras de la cascada de coagulación. La PC, el zimógeno de la PCA, es activada por la trombina unida a trombomodulina sobre la superficie de las células endoteliales. La PCA, en combinación con la proteína S (su cofactor no enzimático), ejerce su función 15 anticoagulante mediante la proteólisis de los factores V y VIII activados. Se han identificado defectos genéticos y adquiridos en la trombomodulina, la PC y la proteína S en pacientes con trombosis venosa y/o arterial. El receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) es una glicoproteína que se expresa en la membrana de las células endoteliales y que liga de manera específica y con alta afinidad la PC y la PCA. Para 20 que el EPCR sea funcional precisa estar unido a una molécula de fosfolípido que estabiliza su estructura tridimensional. La unión de la PC al EPCR incrementa de forma notable su activación por el complejo trombina-trombomodulina sobre la superficie celular endotelial. La misión del EPCR es concentrar la PC en la superficie endotelial y presentarla al complejo trombina-trombomodulina favoreciendo de este modo una eficiente activación de la PC. El EPCR aumenta (unas nueve veces aproximadamente) 25 la tasa de activación de la PC en la superficie de células endoteliales *in vivo* por lo que es el responsable del 90% de los niveles de PCA circulantes. Además, sólo cuando la PCA está unida al EPCR puede activar el receptor-1 activado por proteasa activa que genera una señal celular "citoprotectora" y bloquea la apoptosis.

30 ELEPCR se expresa principalmente en el endotelio de las venas y arterias, sobre todo en las de grande y mediano calibre, y, además, se expresa muy intensamente en el endotelio cerebral. En estos lugares el EPCR previene la trombosis y favorece el buen ~~funcionamiento~~ ~~correcto~~ ~~equilibrado~~ ~~del endotelio~~ ~~como~~ ~~el~~ ~~anticoagulante~~. Existen otras

cada vez más sólidas que apoyan un papel del EPCR en el mantenimiento del embarazo ya que la delección del gen EPCR en ratones "knock out" causa trombosis placentaria y muerte embrionaria temprana en dichos ratones.

5 COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han descubierto que la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en suero o plasma de pacientes con enfermedades autoinmunes, y/o en pacientes con enfermedades vasculares y/o en pacientes con complicaciones obstétricas está incrementada en comparación con muestras procedentes de sujetos sanos, no afectados de tales patologías. Estas evidencias convierten a dichos autoanticuerpos anti-EPCR en un marcador útil para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR, tal como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular o complicaciones obstétricas.

Se ha investigado la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con SAF y su relación con la muerte fetal. También se ha estudiado el efecto de estos autoanticuerpos sobre la generación de PCA en la superficie endotelial. Posteriormente, se ha estudiado la asociación de autoanticuerpos anti-EPCR con la muerte fetal en un estudio pareado de casos y controles. Los resultados obtenidos soportan el hecho de que autoanticuerpos anti-EPCR constituyen un factor de riesgo para un episodio de muerte fetal. Impedir la activación de la PC sobre las superficies celulares que expresan EPCR podría ser una de las maneras por las que estos autoanticuerpos ejercen sus efectos patológicos.

Adicionalmente, se ha puesto a punto un método para la determinación de autoanticuerpos anti-EPCR (IgG, IgA e IgM) y se ha demostrado que éstos están presentes en pacientes diagnosticados de una enfermedad autoinmune (SAF y lupus eritematoso diseminado), en pacientes con enfermedades vasculares (trombosis venosa y arterial) y en mujeres con complicaciones del embarazo. Los ejemplos que acompañan a esta descripción ilustran, entre otras cosas, el hecho de que la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en suero o plasma está incrementada en pacientes con enfermedades autoinmunes (determinado en pacientes con SAF o con lupus eritematoso diseminado), en pacientes con enfermedades vasculares, tales como trombosis arterial, por ejemplo, infarto de miocardio (determinado tanto en pacientes con SAF como en

pacientes sin SAF), o ictus isquémico cerebral (determinado en pacientes con SAF), o trombosis venosa (determinado en pacientes con SAF), así como en pacientes con complicaciones obstétricas, tales como con muerte fetal (determinado tanto en mujeres con SAF como en mujeres sin SAF) o abortos de repetición (determinado en pacientes con SAF).

Por tanto, la presente invención se relaciona, en general, con el empleo de autoanticuerpos anti-EPCR como marcador para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología, en particular, una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR, así como para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto que presente dichas enfermedades.

En un aspecto, la invención se relaciona con un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto, que comprende la detección y/o cuantificación *in vitro* de dichos autoanticuerpos anti-EPCR en una muestra de dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un sujeto que presente una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto, que comprende la detección y/o cuantificación *in vitro* de dichos autoanticuerpos anti-EPCR en una muestra de dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de autoanticuerpos anti-EPCR en un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, o para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un sujeto que presente una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR, en un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto, o para monitorizar *in vitro* el efecto de la

terapia administrada a un sujeto que presente una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto.

- En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto, o para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un sujeto que presente una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra la expresión de rshEPCR en *Pichia pastoris*. El rshEPCR se purificó a partir del sobrenadante de células de *P. pastoris* transformadas de forma estable, tal como se describe en el apartado relativo a los Materiales y Métodos (véase el Ejemplo). 10 µl de cada una de tres fracciones que contenían rhsEPCR fueron separadas por SD-PAGE y las proteínas fueron detectadas utilizando GELCODE Blue (A) o mediante Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-myc (Invitrogen)(B).

La Figura 2 muestra la comparación del nivel de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes diagnosticados de SAF y en controles. Se muestran los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR. Anticuerpos de isotipo IgM: controles (mediana = 45 UA, unidades arbitrarias), pacientes (mediana = 57 UA); anticuerpos de isotipo IgA: controles (mediana = 31 UA), pacientes (mediana = 39 UA); y anticuerpos de isotipo IgG: controles (mediana = 72 UA), pacientes (mediana = 75 UA).

La Figura 3 muestra el efecto de autoanticuerpos anti-EPCR sobre la generación de PCA por células endoteliales, en donde puede observarse la generación de PCA en presencia de autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo M del paciente C comparada con la generación de PCA en ausencia de anticuerpo y en presencia de anticuerpo no inhibidor. Para cada condición se realizaron 2-4 experimentos independientes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, exponemos a continuación el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención.

El término “sujeto” se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

La expresión “enfermedades autoinmunes” se refiere a aquellos trastornos en los que el sistema inmune de un individuo reacciona contra sus propios tejidos determinando una gran variedad de enfermedades; a modo ilustrativo, dichas enfermedades autoinmunes incluyen, entre otras, el SAF, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, vasculitis autoinmunes, etc.

La expresión “enfermedades vasculares” se refiere a aquellas enfermedades que afectan a los vasos sanguíneos. Cuando afecta a un vaso arterial se caracterizan por la falta de irrigación sanguínea de un territorio determinado del organismo y habitualmente es secundaria a la oclusión de alguna arteria, causada ésta por una lesión ateroesclerótica de la pared o por una trombosis, o por ambas a la vez. Cuando afecta a un vaso venoso se caracteriza por dificultad en el retorno de la sangre al corazón desde el territorio del organismo afectado y habitualmente es secundario a la oclusión del vaso venoso por un trombo. Cuando afecta a la microcirculación se caracteriza por la dificultad del órgano cuya microcirculación está afectada para realizar su función. A modo ilustrativo, dichas enfermedades vasculares incluyen, entre otras, enfermedades vasculares arteriales, tales como infarto de miocardio, ictus cerebral, accidente cerebral transitorio, isquemia de extremidades, aterosclerosis, aneurisma, etc., así como enfermedades vasculares venosas, tales como trombosis venosa superficial y profunda, embolia pulmonar, etc, y enfermedades vasculares (trombosis) de la microcirculación como el fallo orgánico que ocurre durante infecciones o enfermedades autoinmunes.

La expresión “complicaciones obstétricas” se refiere a aquellos trastornos que afectan al desarrollo del embarazo, tanto los que afectan a la madre como los que afectan al embrión o al feto. tales como, entre otros, el aborto, la muerte fetal, el nacimiento prematuro, el retraso del crecimiento intrauterino, la eclosión y la pre-eclampsia.

El término "autoanticuerpo" se refiere a los anticuerpos producidos por un sujeto y dirigidos o específicos contra estructuras y tejidos del propio organismo que las produce, tales como, por ejemplo, autoanticuerpos antiplaquetarios, autoanticuerpos antitiroides, autoanticuerpos antiglóbulos rojos, etc. En este sentido el término 5 "autoanticuerpo anti-EPCR" se refiere a inmunoglobulinas o anticuerpos producidos por el propio sujeto y dirigidas específicamente contra el EPCR de sus propios tejidos.

El término "epítopo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína tal como la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

10 Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a cadenas moleculares de aminoácidos que representan un fragmento proteico. Los términos "proteína" y "péptido", se usan indistintamente.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la producción de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con enfermedades autoinmunes, y/o en 15 pacientes con enfermedades vasculares y/o en pacientes con complicaciones obstétricas está aumentada en comparación con muestras procedentes de sujetos sanos, no afectados de tales patologías, lo que convierte a dichos autoanticuerpos anti-EPCR en un marcador útil para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de 20 autoanticuerpos anti-EPCR, tal como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular o complicaciones obstétricas. En una realización particular, la invención permite evaluar el riesgo de enfermedades vasculares o complicaciones obstétricas en pacientes con enfermedad autoinmune o sin ella.

Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "niveles elevados de 25 autoanticuerpos anti-EPCR" se refiere a niveles de UA (unidades arbitrarias) iguales o superiores al percentil 50 de la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de UA iguales o superiores al percentil 60 de la población normal, iguales o superiores al percentil 70 de la población normal, iguales o superiores al percentil 80 de la población normal, iguales o superiores al percentil 90 de la población normal, e iguales o 30 superiores al percentil 95 de la población normal. Debido a la variabilidad existente entre los sujetos (por ejemplo, por razones de raza, etc.) es muy difícil, prácticamente imposible, establecer unos valores absolutos indicativos de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR aplicables a todos los sujetos, por lo que dichos percentiles

pueden calcularse fácilmente mediante un procedimiento convencional que comprende la realización de un ensayo para determinar en un grupo de sujetos normales (es decir, sujetos a los que en el momento de realización del ensayo no se les ha diagnosticado ninguna enfermedad autoinmune y que no han sufrido ninguna enfermedad vascular ni 5 ninguna complicación obstétrica) los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR. La determinación de los autoanticuerpos anti-EPCR se puede realizar por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante el ELISA descrito en el apartado "Materiales y Métodos" (Ejemplo 1). Lógicamente, cada sujeto tendrá un valor determinado de UA de autoanticuerpos anti-EPCR y existirá un valor UA de auto- 10 anticuerpos anti-EPCR en el que por encima de ese valor estén el 50% de la población analizada, constituyendo dicho valor el percentil 50; evidentemente, existirá también un valor por encima del cual estén el 40% de los sujetos normales ensayados y ese valor se constituye el percentil 60, asimismo, también otros valores por encima de los cuales estarán el 30%, 20%, 10% y 5% de los sujetos normales ensayados, 15 constituyendo dichos valores los percentiles 70, 80, 90 y 95, respectivamente.

En este sentido, en un primer aspecto, la invención proporciona un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en dicho sujeto, que comprende la cuantificación *in vitro* de 20 autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra de dicho sujeto.

En una realización particular, la patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto se selecciona entre una enfermedad autoinmune, por ejemplo, SAF, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, vasculitis autoinmunes, etc.; una enfermedad vascular, por ejemplo, una 25 enfermedad vascular arterial, tal como infarto de miocardio, ictus cerebral, accidente cerebral transitorio, isquemia de extremidades, aterosclerosis, aneurisma, etc., o una enfermedad vascular venosa, tal como trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, etc., o una enfermedad vascular de la microcirculación tal como el fallo orgánico que ocurre durante infecciones o enfermedades autoinmunes, etc., y complicaciones. 30 obstétricas, por ejemplo, aborto, muerte fetal, nacimiento prematuro, retraso del crecimiento intrauterino, eclampsia, pre-eclampsia, etc.

El método proporcionado por la presente invención se basa en que los sujetos 35 corresponden a una enfermedad autoinmune, asciende o con complicaciones

obstétricas presentan niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, en comparación con los correspondientes niveles en muestras procedentes de sujetos sin historial clínico de tales enfermedades o complicaciones obstétricas.

Dicho método comprende una etapa de obtención de la muestra del individuo, tal 5 como una muestra de suero o plasma, que se puede obtener por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante una extracción sanguínea.

Las muestras pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de dichas enfermedades autoinmunes o vasculares, o con complicaciones obstétricas; o también de un sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado 10 previamente contra dichas enfermedades o complicaciones.

Dada la naturaleza del método de la invención, la detección y cuantificación de dichos autoanticuerpos anti-EPCR se realiza mediante un ensayo inmunológico acoplado a un marcador que permite detectar y cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-anticuerpo, por ejemplo, un ensayo inmunocromatográfico (látex, oro coloidal, etc.), un ensayo inmunológico en el que marcador es un marcador fluorescente, un isótopo, un metal pesado, una enzima, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un cromógeno, etc.

Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y 20 anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked inmunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), etc.

En una realización particular, el inmunoensayo preferido en el método de la 25 invención que permite la detección y/o cuantificación de dichos autoanticuerpos anti-EPCR es un ELISA que comprende

- a) inmovilizar en un soporte sólido un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR;

- b) incubar dicho polipéptido inmovilizado con una muestra sospechosa de contener autoanticuerpos anti-EPCR procedente de dicho sujeto durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de dichos anticuerpos al polipéptido inmovilizado y la formación de complejos polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR;
- 5 c) retirar la muestra no unida a dicho polipéptido inmovilizado;
- d) incubar dichos complejos polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR con un 10 segundo anticuerpo conjugado a una enzima, en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo capaz de unirse a dichos autoanticuerpos anti-EPCR.

Dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un 15 fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR puede ser bien un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR longitud completa, o bien un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento del EPCR que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR. En una 20 realización particular, dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:

- (i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR, y
- 25 (ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido.

Dicha región B puede estar unida al extremo amino terminal de dicha región A o 30 bien al extremo carboxilo terminal de dicha región A.

En una realización particular, dicha región A comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.

La región B comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión previamente definida y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser utilizada para aislar o purificar una proteína de fusión (denominadas genéricamente péptidos etiqueta o "tag") y/o cualquier secuencia de aminoácidos susceptible de ser utilizada para el anclaje de una proteína de fusión a un soporte sólido puede estar presente en dicha región B. En ocasiones, la secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión puede actuar también como secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido y viceversa. En una realización particular, la región B comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de una proteína de fusión y una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de una proteína de fusión a un soporte sólido.

A modo ilustrativo, dicha secuencia de aminoácidos útil para aislar o purificar una proteína de fusión y/o dicha secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de una proteína de fusión a un soporte sólido puede ser, por ejemplo, Arg-tag, His-tag, FLAG-tag, Strep-tag, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525), una secuencia de aminoácidos tal como: Ala-His-Gly-His-Arg-Pro (2, 4, y 8 copias), Pro-Ile-His-Asp-His-Asp-His-Pro-His-Leu-Val-Ile-His-Ser, Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys (6 repeticiones), β-galactosidasa, VSV-glicoproteína (YTDIEMNRLGK), etc.

En una realización particular, dicha región B está constituida por un polipéptido que comprende un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo (tal como el epítopo c-myc, reconocido por un anticuerpo anti-c-myc) y una cola de histidinas (His-tag).

En el Ejemplo que acompaña a esta descripción se describe la obtención de un polipéptido, denominado rhsEPCR, consistente en una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano (hsEPCR), la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo c-myc y una cola de histidinas y cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 3.

El polipéptido a utilizar en el método de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales, por ejemplo, por expresión en un sistema de expresión adecuado.

El segundo anticuerpo a utilizar en el ELISA previamente mencionado es un 5 anticuerpo específico de isotipo de inmunoglobulinas y procede de una especie diferente a la del sujeto cuya muestra se analiza, lo que permite caracterizar el isotipo de los autoanticuerpos anti-EPCR. A modo ilustrativo, dicho segundo anticuerpo específico de isotipo de inmunoglobulinas se selecciona entre un anticuerpo anti-IgG humana, un anticuerpo anti-IgM humana, un anticuerpo anti-IgA humana, y sus mezclas. En una 10 realización particular, dicho segundo anticuerpo está conjugado a un marcador que permite la detección del complejo, tal como una enzima, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.

El método para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR 15 proporcionado por esta invención se completa comparando los niveles de autoanticuerpos determinados en la muestra del sujeto en cuestión con los niveles normales, entendiendo por niveles normales los de una población de sujetos normales determinado tal como se ha indicado más arriba al definir la expresión "niveles elevados".

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un sujeto que presente una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto, que comprende la cuantificación *in vitro* de dichos autoanticuerpos anti-EPCR en una muestra de dicho sujeto. El método se lleva a cabo tal como se ha mencionado 25 previamente, si bien, en este caso, las muestras proceden de sujetos previamente diagnosticados de alguna enfermedad autoinmune o vascular, o que ha sufrido alguna complicación obstétrica, sometido a tratamiento terapéutico, y permite analizar el efecto de la terapia, es decir, su eficacia y efectividad, aplicada al sujeto en tratamiento con el fin de, por ejemplo, mantener la terapia o modificarla.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de autoanticuerpos anti-EPCR en un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en dicho sujeto. Esta realización comprende el uso

patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en un sujeto se selecciona entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas. Un nivel aumentado de autoanticuerpos anti-EPCR en el sujeto se asocia con un mayor riesgo o predisposición a desarrollar una patología 5 relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en un sujeto, tal como una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y/o complicaciones obstétricas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que 10 contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR en un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti- EPCR en dicho sujeto, que comprende la detección y/o cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos anti-EPCR en una muestra de dicho sujeto. En 15 una realización particular, dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en un sujeto se selecciona entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.

En una realización particular, dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo 20 susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR es un polipéptido como, el definido previamente al describir el ELISA para detectar y/o cuantificar autoanticuerpos anti-EPCR. En una realización particular, dicho polipéptido es el denominado rhsEPCR (Ejemplo), consistente en una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano (hsEPCR), la 25 secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo c-myc y una cola de histidinas y cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en un sujeto que 30 comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR. En una realización particular, dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que

contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR es un polipéptido como el definido previamente al describir el ELISA para detectar y/o cuantificar autoanticuerpos anti-EPCR. En una realización particular, dicho polipéptido es el denominado rhsEPCR (Ejemplo), consistente en una proteína de fusión 5 que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano (hsEPCR), la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo c-myc y una cola de histidinas y cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 3.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

10

EJEMPLO 1

Empleo de autoanticuerpos anti-EPCR como marcadores para el riesgo y la predisposición de un sujeto al desarrollo de patologías relacionadas con la presencia de niveles elevados de dichos autoanticuerpos

15

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

1. Pacientes con SAP y controles

Participaron en el estudio 43 pacientes [44 ± 11 años (media ± desviación estándar (DE)), 39 mujeres y 4 varones] a los que se les había diagnosticado síndrome 20 antifosfolípido (SAF), de acuerdo con los criterios diagnósticos internacionales [Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arthritis Rheum. 1999;42:1309-11; Brandt JT, Barna LK, 25 Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. Thromb Haemost. 1995;74:1597-603] entre febrero de 1998 y marzo de 2002. Todos los pacientes fueron identificados por tener anticoagulante lúpico (ACL) y una historia 30 personal de trombosis venosa ($n = 17$), trombosis arterial ($n = 13$, de los cuales 4 con infarto agudo de miocardio (IAM), 7 con enfermedad trombótica cerebrovascular (ETCV), y 2 en otras regiones) o ambos ($n = 13$ teniendo todos ellos trombosis venosa y arteriales). ETCV ($n = 10$), IAM ($n = 4$), ETCV más IAM ($n = 2$), o trombosis arterial

en la región mesentérica ($n = 1$]). A 27 de dichos pacientes se les diagnosticó un lupus eritematoso sistémico (LES). Se obtuvieron muestras de suero durante el tiempo en el cual el ACL era positivo y por lo menos 3 meses después del último episodio trombótico y se almacenaron a -80°C hasta que fueron estudiadas para detectar 5 autoanticuerpos anti-EPCR.

Como grupo control se incluyeron en el estudio 43 voluntarios sanos sin historia de trombosis ni ACL. Todos los pacientes y controles habían dado su consentimiento informado para la participación en el estudio.

10 2. Mujeres con muerte fetal y controles

Se realizó un estudio caso-control pareado sobre muerte fetal. Se han considerado 87 mujeres, de 19 a 31 años de edad (edad media: 27 años), incluidas en el estudio entre septiembre de 1996 y septiembre de 2002 por un primer episodio de muerte fetal en la décima semana de amenorrea que había ocurrido durante su último 15 embarazo. Se excluyeron mujeres con algún antecedente trombótico, enfermedades infecciosas crónicas o con alguna enfermedad sistémica conocida, diabetes mellitus o con antecedentes de otro tipo de patología de la gestación (aborted espontáneo, eclampsia, restricción de crecimiento fetal intrauterino), así como los casos de muerte fetal debidos a alguna anormalidad cromosómica en el cariotipo o malformación 20 morfológica en el feto. La muerte fetal había ocurrido durante el primer embarazo en 58 mujeres, durante el segundo en 21 mujeres y durante el tercero en las 8 mujeres restantes; en 75 mujeres entre las semanas 10 y 22 y en las 12 mujeres restantes entre las semanas 22 y 36 (valor medio: 17 semanas).

Un grupo control de 87 madres sanas, agrupadas por edad, número de embarazos 25 y tiempo transcurrido desde el final del último embarazo, todas ellas cumplieron todos los criterios de exclusión que el grupo de mujeres con muerte fetal, fueron reclutadas concomitantemente durante el mismo periodo de tiempo, entre mujeres asistidas como pacientes externas en el Departamento de Ginecología del mismo hospital, para un examen médico sistemático.

30 El estudio fue aprobado por los comités de ética de la institución de los inventores y se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes. La inclusión de los pacientes y controles, el consentimiento informado y la recolección de muestras de sangre tuvo lugar por lo menos 6 meses (6-12 meses) después de la muerte fetal. Las

muestras de sangre fueron recogidas, procesadas y almacenadas a -80°C, de acuerdo con los procedimientos convencionales. Los procedimientos de recogida fueron idénticos en todos los casos y en los controles.

5 Expresión de EPCR humano soluble recombinante

Para expresar el EPCR humano recombinante en forma soluble (rhsEPCR), se ha amplificado la secuencia del EPCR humano soluble (hsEPCR), que comprende el dominio extracelular sin su péptido señal ni los dominios de transmembrana e intracelular (residuos 1-139, numeración correspondiente a la forma madura de la proteína después del procesamiento del péptido señal) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores

SEQ ID NO: 1 y

SEQ ID NO: 2,

que añadían un sitio de restricción ClaI y otro NotI en los extremos 5' y 3' respectivamente, utilizando como molde cDNA de células endoteliales. Estas modificaciones permitieron ligar la secuencia de rhsEPCR a los sitios ClaI y NotI del plásmido pPICZ α C (Stratagene, La Jolla, CA) a continuación de la señal de secreción del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción eficiente de muchas proteínas al medio extracelular desde el interior de levaduras.

El inserto se clonó en fase de lectura con un epítopo c-myc y una etiqueta de 6 histidinas presentes en dicho vector pPICZ α C. Debido al proceso de clonaje se añadieron un resto de serina y otro de isoleucina en el extremo amino del rhsEPCR el cual se expresa fusionado, en su extremo carboxi terminal, a una cola que contiene el epítopo c-myc y 6 histidinas para facilitar su purificación y el anclaje del rhsEPCR al fondo de los pocillos de la microplaca mediante un anticuerpo monoclonal anti c-myc. Mediante secuenciación directa se comprobó que la secuencia del inserto y del vector era la correcta. La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia del rhsEPCR obtenido, deducida a partir de la secuencia de DNA, que comprende los residuos añadidos por la técnica de clonaje empleada, los residuos de la región extracelular del rhsEPCR humano, el epítopo myc, y la cola de 6 histidinas.

Con el vector de expresión previamente preparado y tras linearización del mismo con la enzima de restricción PmeI, se transformaron células de *Pichia pastoris* mediante un método químico (Easy Competent, Invitrogen), donde como resultado de integración

mediante recombinación homóloga, de la secuencia codificante de rhsEPCR en el promotor endógeno de respuesta a metanol. El producto de la transformación se cultivó en presencia de zeocina para seleccionar aquellas colonias de *P. pastoris* transformadas con el vector que contenía la secuencia codificante del rhsEPCR que a su vez contiene el gen de la resistencia a la zeocina. Brevemente, las levaduras transformadas se cultivaron en 4 ml de medio BMY [1% de (p/v) de extracto de levadura, 2% (p/v) de peptona, fosfato potásico 100 mM (pH 6,0), 1,34% (p/v) de fuente de nitrógeno de levaduras con sulfato amónico, 4x10-5% (p/v) de biotina] suplementado con 1% (v/v) de glicerol (BMGY) y se incubaron a 28-30°C durante unas 18 horas con agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 2.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se procedió a inducir la expresión de rhsEPCR con metanol al 1% durante 18 horas. Para ello, las células se resuspendieron en 3 ml de BMY suplementado con 0,5% (p/v) de metanol y se incubaron durante 18 horas a 28-30°C aproximadamente con agitación vigorosa. Tras la inducción, las muestras procedentes del medio condicionado se cargaron en geles de NuPAGE Bis-Tris al 12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el rhsEPCR se detectó mediante Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-myc (Invitrogen). Para la producción a gran escala se seleccionó la colonia que secretó la concentración más alta de rhsEPCR. En las colonias seleccionadas por su alta capacidad de producción de rhsEPCR se estudió el metabolismo del metanol (metabolizador rápido o lento) de las colonias, lo que permitió establecer las condiciones óptimas de expresión para la colonia más adecuada. Una vez optimizadas las condiciones de cultivo e inducción con metanol, se aumentó la escala para producir grandes cantidades de rhsEPCR.

25 Purificación del sEPCR recombinante

Dado que *P. pastoris* secreta muy pocas proteínas al medio, un alto porcentaje de las proteínas halladas en el medio de cultivo corresponden a rhsEPCR, lo cual simplificó considerablemente su purificación. Brevemente, el rhsEPCR fue purificado a partir de los sobrenadantes de los cultivos de levadura mediante un proceso de purificación en 3 pasos que comprendía cromatografía de afinidad metálica, intercambio aniónico y cromatografía de filtración en gel. Para ello, el sobrenadante del cultivo se concentró y dializó frente a fosfato sódico 100 mM, NaCl 10 mM, pH 7,6 y, a continuación, se sometió a cromatografía de afinidad metálica en una columna de 5 ml

Hitrap (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) cargada con cobre. La fracción que se unió a la columna se eluyó con un tampón que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se dializó frente a Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) sin NaCl, y, a continuación, se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico en una 5 columna Resource Q column (Amersham Biosciences) y elución con un gradiente 0,0-300 mM de NaCl en un volumen equivalente al de 20 columnas. Las fracciones eluídas que contenían el rhsEPCR se reunieron y concentraron mediante ultrafiltración centrífuga y, a continuación, se aplicaron a una columna a Superdex 75-HR10/30 (Amersham Biosciences) para efectuar la filtración en gel. La concentración de proteína 10 purificada se determinó utilizando el ensayo de proteína total BCA (Pierce, Rockford, IL) y patrones de albúmina sérica bovina (BSA). Para detectar el rhsEPCR purificado, las muestras se cargaron en geles al 12% de NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se realizó una electroforesis en condiciones reductoras seguido de tinción con azul de Coomassie. Un gel de electroforesis se sometió a *electroblotting* y el rhsEPCR 15 fue detectado con el anticuerpo monoclonal anti-myc (Invitrogen). Para estimar el peso molecular del rhsEPCR se utilizó un patrón de peso molecular incluido en cada gel de electroforesis.

ELISA para la determinación de autoanticuerpos anti-EPCR en suero o plasma

20 Se determinaron por separado los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG, IgA o IgM, por ser éstos los encontrados con mayor frecuencia en los pacientes con alteraciones autoinmunes en los que se detectan anticuerpos dirigidos frente a alguna de sus propias estructuras (autoanticuerpos).

En los tres casos se tapizaron microplacas de 96 pocillos (Costar, Acton, MA, 25 EEUU) con 100 µl/pocillo de un anticuerpo monoclonal anti-c-myc (Invitrogen, EEUU) a 1,5 µg/ml en una solución de Na₂CO₃ a 100 mmol/l, pH 9,6, durante la noche a 4°C. Este anticuerpo es utilizado como anticuerpo de captura y está dirigido hacia la etiqueta c-myc añadida y presente en el rhsEPCR. De este modo, el rhsEPCR es anclado al pocillo preservando sus epítopos extracelulares. Después del lavado con TB (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 0,05% de Tween-20, pH 7,4), los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con 3% (ρ/v) de BSA en TE a temperatura ambiente (TA) durante 4,5 horas. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución que contenía 2ug/ml de rhsEPCR en TE, suplementado con 1% de BSA. TE y rhsEPCR se incubó durante 1

horas a temperatura ambiente con agitación suave. En paralelo se incubaron pocillos blanco con TB1 sin rhsEPCR. Después del lavado con TB se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución de la muestra 1:100 (plasma o suero) en TB1 y se incubaron durante la noche a 4°C. A continuación, los pocillos fueron lavados con TB, y los 5 autoanticuerpos anti-EPCR que permanecieron unidos al fondo del pocillo fueron detectados bien con un anticuerpo policlonal murino anti-IgA humana conjugado con peroxidasa (Biotrend), bien con un anticuerpo policlonal murino anti-IgM humana conjugado con peroxidasa (Zymed) o bien con un anticuerpo policlonal murino anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed). Después de un periodo de 2 horas de 10 incubación a temperatura ambiente con agitación suave se realizó un lavado.

Para determinar los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgA o IgM, se añadieron 100 µl de una solución 0,4 mg/ml de o-fenilendiamina (Kodak) que contenía Na₂HPO₄ 0,07 M, citrato de sodio 0,04 M y 0,02 % (v/v) de H₂O₂, pH 5,0. Después de un tiempo de revelado de 5 y 8 minutos en oscuridad para IgA e IgM, 15 respectivamente, se añadieron 100 µl de H₂SO₄ para detener la reacción y 5 minutos después se leyeron las absorbancias a 492 nm en un lector de microplaca (iEMS REader, Labsystems, Finlandia).

En la placa empleada para medir autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG se añadieron 100 µl de una solución 1 ng/ml de 4-nitrofenil fosfatasa (Sigma) en 20 dietanolamina 0,1 M, pH 10,3. Después de 15 minutos, la reacción fue detenida con 100 µl de NaOH 1 M y la absorbancia leída después de la estabilización del color a 405 nm en el lector de microplaca (iEMS REader). Todas las muestras fueron ensayadas al menos dos veces en diferentes ensayos.

Para asegurar que todas las absorbancias medidas en cada placa caían en un rango lineal, se construyó, para cada isotipo, una curva usando diluciones seriadas de la muestra cuya absorbancia fue la más alta registrada. Para permitir comparaciones entre placas, se eligió una muestra para ensayar en cada placa (muestra patrón) lo que permitía introducir un factor de corrección. Las unidades arbitrarias (UA) fueron definidas de la siguiente manera: para cada muestra paciente (muestra problema) la 25 absorbancia específica se calculó sustrayendo la absorbancia de los pocillos blanco y, a continuación, multiplicando por 1.000 y por un factor de corrección correspondiente a la relación entre la absorbancia específica de la muestra patrón ensayada en una placa dada (placa de referencia) y en la placa donde la muestra problema es ensayada. Los 30

coeficientes de variación inter e intra-ensayo fueron evaluados con el uso de cinco muestras probadas cinco veces para el coeficiente de variación inter-ensayo (menor de 5%) y en tres ocasiones diferentes para calcular el coeficiente de variación inter-ensayo (menor de 10%).

5

Generación de PCA en células endoteliales cultivadas

La línea celular utilizada fue EA.hy926, una línea de células endoteliales humanas transformada que ha retenido la capacidad de expresar trombomodulina y EPCR (Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:10212-6). Se incubaron 5x10⁴ células por pocillo de una placa de 96 pocillos con 0,02 U/ml de trombina (0,17 nM) (ERL, Swansea, Reino Unido) y concentraciones crecientes de PC (Baxter, Deerfield, IL, USA) oscilando entre 50 y 1.000 nM en tampón Tris 20 mM, pH 7,4, suplementado con NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 0,6 mM, 1% de BSA, 0,001% de Tween-20 y 0,02% de NaN₃. Después de 45 minutos a temperatura ambiente se añadió lepirudina (Schering AG, Berlin, Germany) a una concentración final de 0,2 µl, para inhibir la trombina y 3-4 minutos después se añadió el sustrato cromogénico S-2366 (Chromogenix, Milan, Italy) a una concentración final de 0,4 mM con el objeto de monitorizar su proteólisis por la PCA. El incremento en la absorbancia a 405 nm fue registrado cinéticamente en un lector de microplaca (iEMS REader, Labsystems, Finlandia). El ajuste de los datos de la curva a la ecuación de Michaelis-Menten fue realizado usando el programa Enzfitter (Biosoft, Cambridge, Reino Unido) que calculó el valor de la Km de la activación de la PC bajo esas condiciones. Donde fue necesario, se añadieron 45 µg/ml de autoanticuerpos anti-EPCR purificados de pacientes (véase más abajo) simultáneamente con la trombina y la PC. Así, el efecto de los autoanticuerpos anti-EPCR sobre la activación de la PC podría ser analizado.

Purificación de anticuerpos anti-EPCR

30 1. Purificación de anticuerpos IgM

Muestras de suero de 1 ml que contenían autoanticuerpos anti-EPCR fueron diluidas en tampón fosfato cefino (PBS) (fósfato de sodio 100 mM, NaCl 0,15 M, pH=7,4) y pasadas a través de un filtro de 0,45 µm. El filtrado fue sometido a uno

columna HitTrap activada por NHS HP (Amersham Biosciences) donde previamente se había inmovilizado un anticuerpo monoclonal murino anti-IgM humana (Maruyama S, Kubagawa H, Cooper MD. Activation of human B cells and inhibition of their terminal differentiation by monoclonal anti-murine antibodies. J Immunol. 1985;135:192-9). La IgM humana fue eluida con 5 ml de glicina 0,1 M, pH 2,5 y recogida en 100 µl de Tris 1 M, pH 9,0. La fracción que contenía la IgM humana fue concentrada y dializada frente a TB suplementado con CaCl₂ 5 mM y MgCl₂ 0,6 mM, pH 7,4.

2. Purificación de anticuerpos IgA

Muestras de 1 ml de suero fueron diluidas en PBS y aplicadas manualmente a una columna de jacalina (Pierce). La fracción adsorbida fue eluida con 2 ml de melibiosa 0,1 M en PBS y subsiguientemente dializada frente a PBS. Puesto que fueron necesarios pasos posteriores de purificación, las muestras fueron aplicadas a una columna de afinidad HiTrap Protein G HP (Amersham Biosciences) para retirar la IgG contaminante. El producto no ligado que contenía la fracción IgA fue dializado frente a KH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, y finalmente aplicado a una columna de afinidad HiTrap Blue HP (Amersham Pharmacia Biotech) para retirar la albúmina. El material no ligado que contenía la fracción de IgA purificada fue recogido y dializado frente a tampón TB suplementado con CaCl₂ 5 mM y MgCl₂ 0,6 mM, pH 7,4.

20

3. Purificación de anticuerpos IgG

Muestras de suero de 1 ml que contenían autoanticuerpos anti-EPCR fueron diluidas en tampón fosfato salino (PBS) (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 0,15 M, pH=7,4) y pasadas a través de un filtro de 0,45 µm. El filtrado fue aplicado a una columna HitTrap Protein G HP (Amersham Biosciences). La IgG humana fue eluida con 5 ml de glicina 0,1 M, pH 2,5 y recogida en 100 µl de Tris 1 M, pH 9,0. La fracción que contenía la IgM humana fue concentrada y dializada frente a TB suplementado con CaCl₂ 5 mM y MgCl₂ 0,6 mM, pH 7,4.

30 Preparación de una columna de afinidad rhsEPCR

El rhsEPCR (2 mg en 3 ml de NaHCO₃ 100 mM, pH 8,5) fue unido a una columna de afinidad HitTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de que la reacción hubiera sido detenida con

glicina 0,1 M, la columna de rhsEPCR fue lavada extensamente con NaCl 2 M. De esta manera, la columna de rhsEPCR era capaz de ligar PC en TBS, pH 7,4, suplementado con CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 0,6 mM. La PC podía ser eluída de la columna con TBS suplementado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (datos no mostrados). Puesto que el rhsEPCR ligado a la columna mantenía su capacidad para unirse a la PC, seguramente debería retener la conformación nativa y los epítopos reconocidos por los autoanticuerpos. Por tanto, la columna así preparada era adecuada para eliminar autoanticuerpos anti-EPCR a partir de una muestra de suero o plasma.

10 Métodos estadísticos

En el estudio de casos y controles de SAF, la comparación entre pacientes (casos) y controles para la frecuencia de niveles elevados de anticuerpos anti-EPCR IgM, IgA e IgG fue realizada según el test de la chi-cuadrado. La “odds ratio” (OR) (Martínez-González MA, de Irala-Estevez J & Guillén Grima F, (1999), ¿Qué es una odds ratio?, Medicina Clínica, 112, 11:416-422) y el intervalo de confianza del 95% se calcularon como una medida de la asociación entre SAF y autoanticuerpos anti-EPCR.

En el estudio de pareado de casos y controles de muerte fetal, la comparación entre casos y controles para variables continuas y por categorías fue realizada según el test-t para muestras pareadas y con el test McNemar, respectivamente. La asociación entre los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgG e IgM con el ACL y con anticuerpos anti-cardiolipina de isotipo IgM se evaluó con coeficientes de correlación para variables continuas y con el test de Mann-Whitney para variables por categorías.

Para evaluar el riesgo de muerte fetal asociado con altos niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgG e IgM, se utilizó un análisis de regresión múltiple con pares de casos y controles. Las principales variables independientes fueron los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgG e IgM por categorías, de acuerdo con la distribución de esas immunoglobulinas en los controles. Se utilizaron diferentes puntos de corte (cut-off) para determinar los niveles asociados con un riesgo más alto. Se realizaron análisis univariados y multivariados, ajustando por factores de riesgo de muerte fetal conocidos. No fue posible incluir en el modelo completo los factores V Leiden (FVL) y ACL, lo que se consideraron entonces dos modelos para encotrar si efecto de anticuerpos anti-EPCR.

(1) introduciendo simultáneamente los niveles de autoanticuerpos anti-EPCR isotipos IgM e IgG, anticuerpo anti-cardiolipina de isotipo IgM, ACL y protrombina G20210A, y

5 (2) igual que el modelo 1, pero ajustando por la presencia/ausencia de FVL, en lugar de ACL.

El modelo (1) fue usado para evaluar la hipótesis de que los anticuerpos anti-cardiolipina y el ACL eran marcadores, más que factores etiológicos, de un estado protrómbico causado por autoanticuerpos anti-EPCR. Todos los cálculos fueron realizados con SPSS, versión 10.0 (SPSS Inc.).

10

II. RESULTADOS

Con el objeto de poder investigar la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en plasma y suero, en primer lugar se produjo rhsEPCR usando el sistema de expresión de la levadura *P. pastoris*. Usando el protocolo descrito, se pudo purificar de un cultivo de 15 *P. pastoris* más de 5 mg de rhsEPCR. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y análisis Western blot con el anticuerpo monoclonal de anti-myc, el rhsEPCR aparecía como una banda única y ligeramente heterogénea reflejando los distintos grados de glicosilación, tal como se había descrito previamente (Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, 20 Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. J Biol Chem. 1996;271:17491-8) [véase la Figura 1].

El rhsEPCR fue capaz de inhibir la actividad anticoagulante de la PCA en un ensayo de coagulación, tal como se ha descrito previamente (Regan LM, Stearns- 25 Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Fukudome K, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. J Biol Chem. 1996;271:17499-503) (datos no mostrados). Además de unir la PC con la afinidad esperada (véase más abajo), la activación de la PC por trombina sobre la superficie de las células endoteliales estaba 30 caracterizada por una Km de 51 ± 10 nM. La activación disminuyó considerablemente en presencia de rhsEPCR 2 μ M ($K_m = 1.000$ nM aproximadamente), lo que significa una K_i de 70 nM aproximadamente, sugiriendo que el rhsEPCR se une a la PC con una eficiencia similar a la del EPCR nativo, tal como ha sido descrito previamente

(Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem.* 1996;271:17491-8; Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Fukudome K, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. *J Biol Chem.* 1996;271:17499-503). Estas evidencias sugieren fuertemente la correcta actividad y conformación del rhsEPCR, lo que permite utilizarlo para detectar anticuerpos contra EPCR humano.

10 Autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con SAF

Considerando niveles altos a aquellos superiores al percentil 97 de cada grupo control, los niveles altos de autoanticuerpo anti-EPCR isotipos IgM, IgA o IgG estuvieron asociados con SAF [OR = 4,47; IC 95%: 1,15-17,40] Como se muestra en la Tabla 1. Los niveles extremadamente elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, como se observa en la figura 2, se detectaron únicamente en sujetos diagnosticados de SAF: tres pacientes mostraron un nivel muy alto de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM (paciente A = 407 UA, paciente B = 301 UA y paciente C = 293 UA), dos pacientes con SAF mostraron unos niveles muy altos de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgA (paciente D = 795 UA y paciente B = 475 UA, quien también mostró altos niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM) y dos niveles altos de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG (paciente E = 230 UA y paciente F = 220 UA). Los seis pacientes fueron mujeres con historia previa de trombosis, uno de los criterios de selección (ictus en pacientes A, C, D y F; enfermedad cardiovascular en paciente E, trombosis venosa en pacientes A, B, D y F). Lo más interesante es el hecho de que todas las mujeres que portaban autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgM e IgA menos la paciente B, que no fue evaluable, sufrieron múltiples episodios de muerte fetal.

Debido a este hallazgo se enfocó el análisis sobre la posible asociación entre autoanticuerpos anti-EPCR y muerte fetal.

Tabla 1**OR de SAF asociado con anticuerpos anti -EPCR**

Autoanticuerpos anti-EPCR (percentil superior al 97%)	SAF (n = 43)	Control (n = 43)	OR (IC 95%)
IgG	3	1	3,10 (0,30-31,50)
IgM	6	1	6,80 (0,80-59)
IgA	3	1	3,10 (0,30-31,50)
IgG + IgM + IgA	11	3	4,47 (1,15-17,4)

Caracterización bioquímica de anticuerpos anti-EPCR

5 La fracción de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM, Ig A e IgG de los pacientes con niveles extremadamente elevados fueron purificadas a partir de 1 ml de suero. La fracción de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM del paciente C fue capaz de disminuir la generación de PCA por células endoteliales cultivadas en presencia de trombina (20% de la capacidad residual de activaciones de la PC, p = 10 0.02). El efecto inhibitorio era dependiente de la dosis. Para demostrar que este efecto de la fracción de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM del paciente con SAF era debida a un anticuerpo específico frente a EPCR, la muestra fue desprovista por completo de autoanticuerpo anti-EPCR específico cargándola en una columna de afinidad donde el rhsEPCR fue inmovilizado. La fracción obtenida en tal forma perdió 15 la capacidad inhibitoria sobre la generación de PCA (87,6% de generación de PC) lo que significa que el responsable de ese fenómeno tenía que ser un autoanticuerpo anti-EPCR específico. Ninguna de las otras fracciones purificadas a partir de pacientes con SAF fueron capaces de modificar la capacidad de las células endoteliales de generar PCA (Figura 3).

20

Autoanticuerpos anti-EPCR en mujeres con muerte fetal

Las frecuencias del factores de riesgo previamente relacionado con la muerte fetal y de los anticuerpos anti-EPCR en el grupo de pacientes y controles estudiado se muestran en la Tabla 2.

25

Tabla 2

ORs univariantes y sus intervalos de confianza para muerte fetal asociada con las diferentes variables estudiadas

	Muerte fetal (n=87)	Controles (n=87)	OR pareadas	IC 95%	p
Anti-EPCR IgM	16	3	14,0	(1,8-106,4)	0,01
Anti-EPCR IgG	13	4	4,3	(1,2-15,2)	0,02
Factor V Leiden	6	1	6,0	(0,7-49,8)	0,1
Protrombina G20210A	3	1	3,0	(0,3-28,8)	0,34
ACL	7	1	7,0	(0,9-56,9)	0,07
Anticardiolipina IgM	9	2	5,0	(1,1-22,8)	0,04
Anticardiolipina IgG	1	0	-	-	-

5 El percentil del 95% de los niveles de autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo IgM en el grupo control fue de 99 UA. De los 87 pacientes, 16 pacientes (18%) tuvieron valores que excedieron este punto de corte frente a los 3 sujetos del grupo control (n = 87). La OR no ajustada para muerte fetal en pacientes con niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM superior al percentil del 95% comparados con aquéllas que 10 tuvieron un valor más bajo, fue de 14 (intervalo de confianza (IC) de 95%, 1,8 a 106,4). Cuando el punto de corte fue colocado en el percentil del 90% (83 UA), la OR fue de 5,2 (IC 95%, 1,8 a 15,3).

15 El percentil 95 de los niveles de autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo IgG en el grupo control fue de 94 UA. De los 87 pacientes, 13 pacientes (15%) tuvieron valores que excedieron ese punto de corte frente a los 4 sujetos del grupo control. La OR no ajustada para muerte fetal en pacientes con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG superior a un percentil del 95% fue de 4,3 (IC 95%, 1,2 a 15,2). Cuando el punto de corte se colocó en el percentil del 90% (83,4 UA), la OR era de 2,3 (IC 95%, 0,9 a 5,6).

20 Adicionalmente, se ha realizado un análisis multivariado ajustando por potenciales factores de confusión. Como se indicó anteriormente, fue imposible incluir el FVL y el ACL en el mismo modelo multivariado por lo que se consideraron dos modelos diferentes. El resultado es ejercido por autoanticuerpos anti-EPCR tanto IgM

anticuerpos ACL y anticardiolipina) y protrombina G20210A y el Modelo (2), en el que se incluyó el FVL pero no el ACL. La OR asociada con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM superior al percentil 95 en el Modelo (1) fue de 23,1 (IC 95%, 2 a 266,3) y en el Modelo (2) de 31,0 (IC 95%, 2 a 384,3). La OR asociada con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG superior al percentil 95 en el Modelo (1) fue de 6,8 (IC 95%, 1,2 a 38,4). De acuerdo con el Modelo (2), que incluye el factor V de Leiden en lugar del ACL, la OR asociada con autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG superior al percentil 95 era de 11,0 (IC 95%, 1,6 a 73,5). Los resultados se recogen en la Tabla 3.

10

Tabla 3

**ORs multivariadas y sus intervalos de confianza del 95% para muerte fetal
asociada con los niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR**

Autoanticuerpos anti-EPCR	Modelo 1			Modelo 2		
	OD pareada	IC 95%	p*	OD pareada	IC 95%	p*
Anti-EPCR IgM	23,0	2.0-266,3	0,012	31,0	2.0-384,3	0,007
Anti-EPCR IgG	6,8	1,2-38,4	0,029	11,0	1,6-73,5	0,013

15 Estos resultados indican que los autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgM e IgG son factores de riesgo independientes para la muerte fetal. Sin embargo los niveles elevados de IgA no se asocian de manera significativa con la muerte fetal en este grupo de mujeres estudiado.

III. DISCUSIÓN

20 Se ha implementado un método, en particular, un ELISA, que permite detectar la presencia de autoanticuerpos frente a EPCR humano. Utilizando este sistema se ha estudiado un grupo de pacientes con SAF caracterizado por trombosis y ACL y se ha demostrado, por primera vez en patología humana, la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR específicos, de isotipos IgM, IgG e IgA. Se ha estudiado el subgrupo de pacientes 25 con SAF con ACL porque ha sido relacionado con un mayor riesgo de trombosis, y, por ello, se pensó que sería un grupo con elevada probabilidad de presentar autoanticuerpos directamente relacionados con la manifestación clínica. De hecho, se han encontrado numerosos pacientes con un nivel muy elevado de autoanticuerpos anti-EPCR.

Estos autoanticuerpos podrían proporcionar una explicación para la trombosis y pérdida de embarazo en pacientes con SAF. En primer lugar, el EPCR es una molécula que se expresa en el endotelio de los vasos sanguíneos grandes y en el trofoblasto. Las inmunoglobulinas IgM e IgG pueden fijar y activar el complemento, si estos anticuerpos 5 se dirigen contra EPCR podrían activar el complemento en el endotelio y lesionarlo promoviendo la trombosis a ese nivel. En segundo lugar, se ha demostrado que la fracción de IgM de un paciente con elevados niveles de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM puede reducir seriamente la generación de PCA por células endoteliales en presencia de trombina. Este efecto inhibitorio desaparece cuando se elimina 10 específicamente la IgM dirigida contra EPCR mediante el paso del conjunto de la fracción de IgM a través de una columna de afinidad por EPCR, lo que significa que el efecto inhibitorio es debido al autoanticuerpo anti-EPCR de isotipo IgM.. Este anticuerpo conduciría probablemente a un bajo nivel de PCA *in vivo*, lo cual es, en sí mismo, un fuerte factor de riesgo de trombosis.

15 Al seleccionar los pacientes según el criterio de trombosis venosa y/o arterial no se pudo evaluar el riesgo de trombosis asociada con los autoanticuerpos anti-EPCR. Por el contrario, se pudo detectar un mayor nivel de autoanticuerpos anti-EPCR, particularmente del isotipo IgM, en mujeres con historia previa de muerte fetal que en mujeres sin ella. A la vista de dichos resultados en el estudio piloto se decidió llevar a 20 cabo un estudio pareado de casos y controles para evaluar el riesgo de primer episodio de muerte fetal inexplicable en una población general de mujeres asociado con la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR. Se ha encontrado que un elevado nivel de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgM (definido como un valor superior al percentil 95 de la distribución de valores en sujetos control) era un fuerte factor de riesgo para los 25 primeros episodios de muerte fetal, con un riesgo relativo de 23 ó 31 comparado con los niveles inferiores. Niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipo IgG constituían también un fuerte factor de riesgo, pero más débil que el del isotipo IgM, con un riesgo relativo de 7 u 11 dependiendo del modelo matemático utilizado. En el análisis univariado, el ACL y el anticuerpo anticardiolipina de isotipo IgM fueron 30 asociados con un mayor riesgo de muerte fetal pero dicha asociación fue atenuada en el modelo multivariado debido, quizás, a que la información dada por los anticuerpos anticardiolipina clásicos es debida a los autoanticuerpos anti-EPCR asociados, que están en un mayor porcentaje de muerte fetal que sus un menor porcentaje de riesgo:

Asimismo, se estudió la presencia de FVL y protrombina G20210A, que han sido recientemente asociadas con un mayor riesgo de muerte fetal tardía, encontrándose un mayor riesgo tanto en el análisis univariado como multivariado asociado con ese polimorfismo, pero el riesgo no era estadísticamente significativo, probablemente 5 debido al número de pacientes incluidos en el estudio.

En conclusión, este estudio pone de manifiesto, por primera vez, la presencia de autoanticuerpos anti-EPCR en pacientes con SAF y trombosis. La presencia de autoanticuerpos anti-EPCR de isotipos IgM e IgG aumenta el factor de riesgo del primer episodio de muerte fetal. Estos autoanticuerpos pueden por sí mismos contribuir a la 10 trombosis y a la muerte fetal que ocurre en el SAF y en la población general.

EJEMPLO 2

Detección de autoanticuerpos anti-EPCR en mujeres con infarto de miocardio

Grupo de estudio: 142 mujeres (edad, 39 ± 5 años, media \pm desviación típica) con infarto 15 de miocardio y 142 mujeres sanas (edad, 39 ± 5 años) emparejadas por edad y procedencia geográfica. Se estudiaron los factores de riesgo clásicos de infarto de miocardio (hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, consumo de tabaco y consumo de anticonceptivos orales). Se determinaron los autoanticuerpos anti-EPCR IgG, IgM e IgA en muestras de plasma siguiendo el protocolo del ensayo ELISA descrito en el 20 apartado "Materiales y Métodos" (Ejemplo 1).

Resultados: Los niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR, considerados estos como valores por encima del percentil 93 de la distribución de los niveles de anticuerpos anti-EPCR en el grupo control, se asociaron con un aumento del riesgo del infarto. En el análisis multivariado los niveles elevados de anticuerpos anti-EPCR se 25 asociaron con una Odds ratio ajustada (OR) de 3,5 con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%) de 1,4-8,9 para la IgA, en el caso de la IgM OR = 3,0; IC 95%: 1,2-7,5.

Conclusión: Los niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR son un factor de riesgo independiente de infarto de miocardio en mujeres.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un sujeto a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en dicho sujeto, que comprende la cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra de dicho sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto se selecciona entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto es una enfermedad autoinmune seleccionada entre síndrome antifosfolípido, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y vasculitis autoinmunes.
4. Método según la reivindicación 2, en el que dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto es una enfermedad vascular seleccionada entre trombosis arterial, ateroesclerosis, trombosis venosa y trombosis de la microcirculación.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha enfermedad vascular es un infarto de miocardio, un ictus cerebral, accidente cerebral transitorio, isquemia de extremidades, aterosclerosis, aneurisma, trombosis, trombosis venosa superficial, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar o trombosis de la microcirculación.
6. Método según la reivindicación 2, en el que dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto es una complicación obstétrica seleccionada entre aborto, muerte fetal, nacimiento prematuro, retraso del crecimiento intrauterino, eclampsia e *pre-eclampsia*.

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de suero o plasma de dicho sujeto.

5

8. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un ser humano.

10

10. Método según la reivindicación 1, en el que la cuantificación de dichos autoanticuerpos anti-EPCR se realiza mediante un ensayo inmunológico acoplado a un marcador.

15

a) inmovilizar en un soporte sólido un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR;

20

b) incubar dicho polipéptido inmovilizado con una muestra sospechosa de contener autoanticuerpos anti-EPCR procedente de dicho sujeto durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de dichos anticuerpos al polipéptido inmovilizado y la formación de complejos polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR;

25

c) retirar la muestra no unida a dicho polipéptido inmovilizado;

d) incubar dichos complejos polipéptido-autoanticuerpo anti-EPCR con un segundo anticuerpo conjugado a una enzima, en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo capaz de unirse a dichos autoanticuerpos anti-EPCR.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido se selecciona entre:

30

un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del EPCR longitud completa, y

un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento del EPCR que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR.

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:

(i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de 5 aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR, y

(ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte 10 sólido.

13. Método según la reivindicación 12, en el que dicha región B está unida al extremo amino terminal de dicha región A.

15 14. Método según la reivindicación 12, en el que dicha región B está unida al extremo carboxilo terminal de dicha región A.

16 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que dicha región A comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.

20 16. Método según la reivindicación 12, en el que dicha secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o dicha secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido presente en dicha región B comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre Arg-tag, 25 His-tag, FLAG-tag, Strep-tag, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, Ala-His-Gly-His-Arg-Pro (2, 4, y 8 copias), Pro-Ile-His-Asp-His-Asp-His-Pro-His-Leu-Val-Ile-His-Ser, Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys (6 30 repeticiones), β-galactosidasa y VSV-glicoproteína.

17. Método según la reivindicación 16, en el que dicha región B está constituida por un polipéptido que comprende un epítopo c-myc susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-c-myc y una cola de histidinas (His-tag).
- 5 18. Método según la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano, la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo c-myc y una cola de histidinas (His-tag).
- 10 19. Método según la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.
- 15 20. Método según la reivindicación 10, en el que dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo específico de isotipo de inmunoglobulinas y procede de una especie diferente a la del sujeto cuya muestra se analiza.
- 20 21. Método según la reivindicación 20, en el que dicho segundo anticuerpo específico de isotipo de inmunoglobulinas se selecciona entre un anticuerpo anti-IgG humana, un anticuerpo anti-IgM humana, un anticuerpo anti-IgA humana, y sus mezclas.
22. Método según la reivindicación 10, en el que dicho segundo anticuerpo está conjugado a una enzima seleccionada entre peroxidasa y fosfatasa alcalina.
- 25 23. Método según la reivindicación 1, que comprende, además, la comparación del nivel de autoanticuerpos anti-EPCR determinado en la muestra del sujeto con los niveles normales.
- 30 24. Un método para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un sujeto que presente una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-EPCR en dicho sujeto, que comprende la cuantificación *in vitro* de dichos autoanticuerpos anti-EPCR en una muestra de dicho sujeto.

25. Método según la reivindicación 24, en el que dicho sujeto es un sujeto previamente diagnosticado de alguna enfermedad autoinmune o vascular, o que ha sufrido alguna complicación obstétrica, y está sometido a tratamiento terapéutico.
- 5 26. Empleo de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en dicho sujeto.
- 10 27. Empleo según la reivindicación 26, en el que dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto se selecciona entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.
- 15 28. Empleo de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR en un método para evaluar el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) en dicho sujeto, que comprende la cuantificación *in vitro* de autoanticuerpos frente al EPCR en una muestra de dicho sujeto.
- 20 29. Empleo según la reivindicación 28, en el que dicha patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto se selecciona entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y complicaciones obstétricas.

30. Empleo según la reivindicación 28, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:

(i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR, y

5 (ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido.

10

31. Empleo según la reivindicación 30, en el que dicha región A comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.

15 32. Empleo según la reivindicación 30, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano, la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo c-myc y una cola de histidinas (His-tag).

20 33. Empleo según la reivindicación 30, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

25 34. Un kit para evaluar *in vitro* el riesgo y la predisposición de un individuo a desarrollar una patología relacionada con la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del receptor endotelial de la PC/PC activada (EPCR) o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un autoanticuerpo anti-EPCR.

30 35. Kit según la reivindicación 34, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende:

(i) una región A constituida por un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del EPCR o un fragmento de la misma que contiene, al menos, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-EPCR, y

(ii) una región B constituida por un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos útil para el aislamiento o purificación de dicha proteína de fusión y/o una secuencia de aminoácidos útil para el anclaje de dicha proteína de fusión a un soporte sólido.

5

36. Kit según la reivindicación 35, en el que dicha región A comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano.

37. Kit según la reivindicación 35, en el que dicho polipéptido es una proteína de
10 fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la parte soluble del EPCR humano, la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo c-myc y una cola de histidinas (His-tag).

38. Kit según la reivindicación 35, en el que dicho polipéptido es una proteína de
15 fusión que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

39. Kit según la reivindicación 34, en el que dicha patología relacionada con la
presencia de niveles elevados de autoanticuerpos frente al EPCR en un sujeto se
selecciona entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad vascular y
20 complicaciones obstétricas.

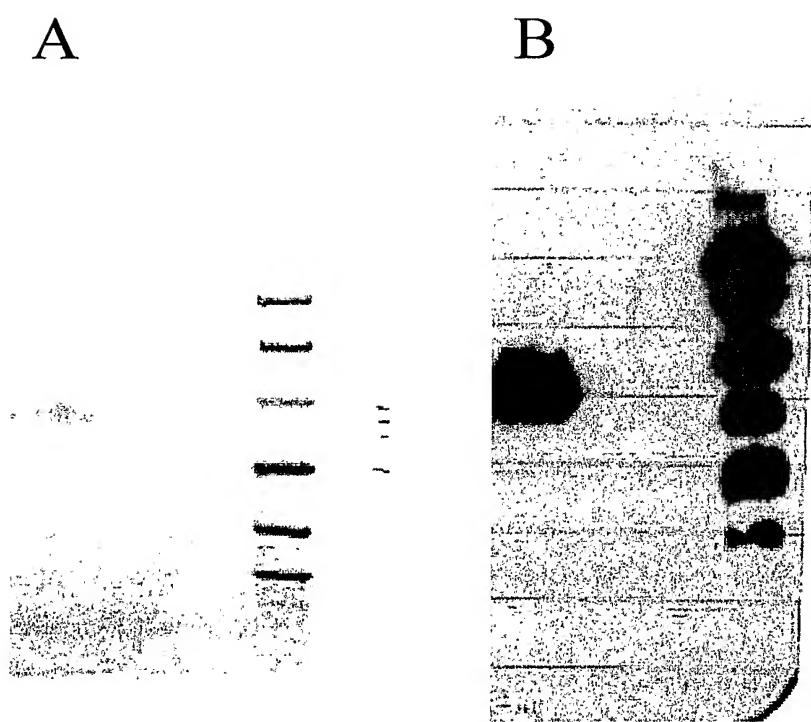


Figura 1

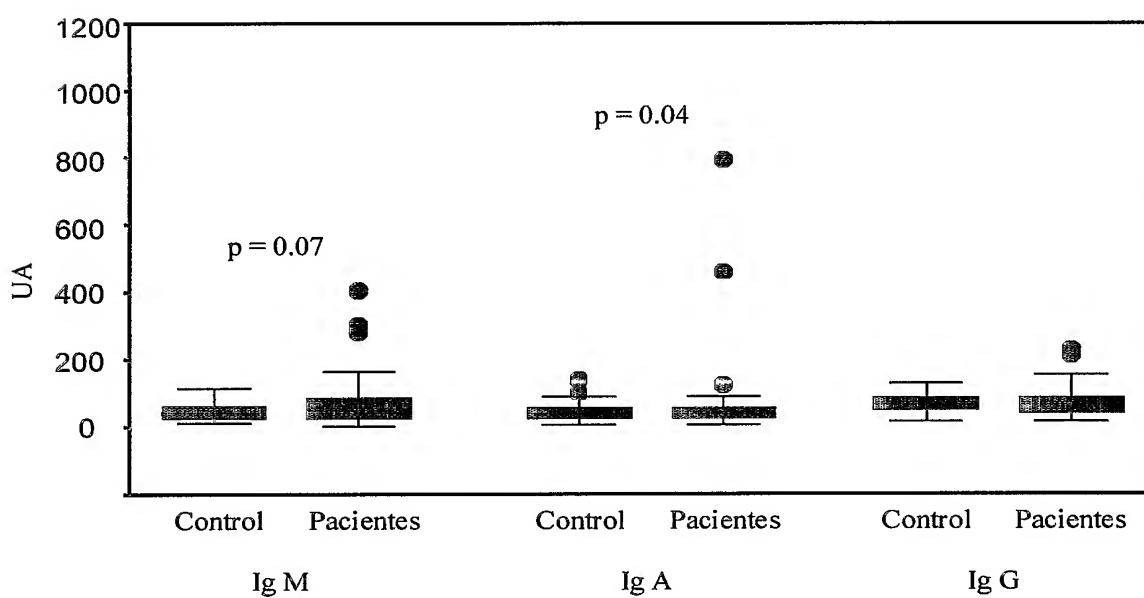


Figura 2

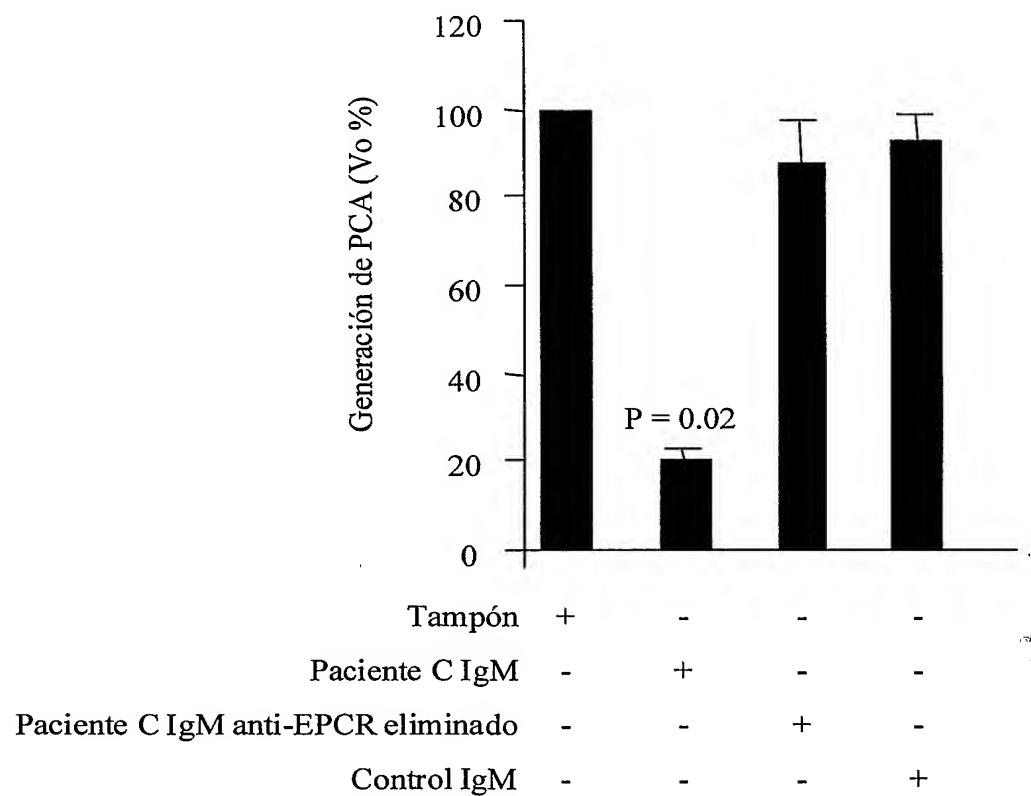


Figura 3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Proyecto de Biomedicina CIMA, S.L.

<120> Método para evaluar el riesgo y la predisposición a desarrollar una patología relacionada con la presencia de autoanticuerpos frente al EPCR

<160> 3

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador

<400> 1

agcttggcat atcgatttagc caagacgcct cagatg

36

<210> 2

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador

<400> 2

tattctatgc ggccgccgaa gtgttaggagc ggcttg

36

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

<400> 3

Ser Ile Ser Gln Asp Ala Ser Asp Gly Leu Gln Arg Leu His Met Leu
1 5 10 15

Gln Ile Ser Tyr Phe Arg Asp Pro Tyr His Val Trp Tyr Gln Gly Asn
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly His Leu Thr His Val Leu Glu Gly Pro Asp Thr
35 40 45

Asn Thr Thr Ile Ile Gln Leu Gln Pro Leu Gln Glu Pro Glu Ser Trp
50 55 60

Ala Arg Thr Gln Ser Gly Leu Gln Ser Tyr Leu Leu Gln Phe His Gly
65 70 75 80

Leu Val Arg Leu Val His Gln Glu Arg Thr Leu Ala Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Ile Arg Cys Phe Leu Gly Cys Glu Leu Pro Pro Glu Gly Ser Arg Ala
100 105 110

His Val Phe Phe Glu Val Ala Val Asn Gly Ser Ser Phe Val Ser Phe
115 120 125

Arg Pro Glu Arg Ala Leu Trp Gln Ala Asp Thr Gln Val Thr Ser Gly
130 135 140

Val Val Thr Phe Thr Leu Gln Gln Leu Asn Ala Tyr Asn Arg Thr Arg
145 150 155 160

Tyr Glu Leu Arg Glu Phe Leu Glu Asp Thr Cys Val Gln Tyr Val Gln
165 170 175

Lys His Ile Ser Ala Glu Asn Thr Lys Gly Ser Gln Thr Ser Arg Ser
180 185 190

Tyr Thr Ser Ala Ala Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
195 200 205

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His His
210 215 220